



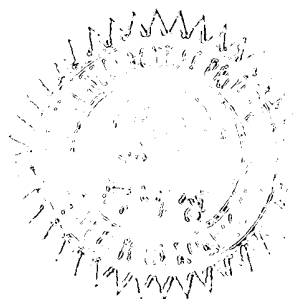
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 특허출원 2001년 제 17100 호
Application Number PATENT-2001-0017100

출원 년 월 일 : 2001년 03월 31일
Date of Application MAR 31, 2001

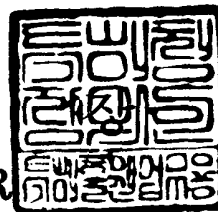
출원 인 : 제노백(주)
Applicant(s) Zenovac Co., Ltd.



2001 년 09 월 04 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.03.31
【발명의 명칭】	혈액 여과지에서의 효소면역측정법을 이용한 셀룰로플라스민 농도 측정 방법 및 이 방법을 이용한 윌슨병 스크리닝 검사용 키트와 진단 시약
【발명의 영문명칭】	Method of measurement for ceruloplasmin concentration with enzyme-linked immunosorbent assay in filter paper, and Wilson's disease screening test kit and diagnosis reagent using thereof
【출원인】	
【명칭】	제노백 (주)
【출원인코드】	1-2000-048470-2
【대리인】	
【성명】	고 승 호
【대리인코드】	9-1998-000118-1
【포괄위임등록번호】	2000-059758-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	한 시 훈
【성명의 영문표기】	HAN,SI HOON
【주민등록번호】	580308-1023118
【우편번호】	463-060
【주소】	경기도 성남시 분당구 이매동 삼환아파트 1104-2001
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이 수 영
【성명의 영문표기】	LEE,SU YOUNG
【주민등록번호】	620318-2023110
【우편번호】	440-814

【주소】	경기도 수원시 장안구 연무동 251 광교프라자 1101호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	장 영 주
【성명의 영문표기】	JANG, YOUNG JU
【주민등록번호】	561120-2029318
【우편번호】	463-825
【주소】	경기도 성남시 분당구 수내동 76번지 푸른마을 507동 202호
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 고 승 호 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	5 면 5,000 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	16 항 621,000 원
【합계】	655,000 원
【감면사유】	소기업 (70%감면)
【감면후 수수료】	196,500 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 소기업임을 증명하는 서류_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 완전셀룰로플라스민(holoceruloplasmin)의 농도를 측정하는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 완전셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체 (polyclonal antibody)와 완전셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체 (monoclonal antibody)를 사용하여 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)을 통해 얻은 흡광도 표준곡선을 이용하여 혈액 스왓에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법에 관한 것이다.

【대표도】

도 3

【색인어】

월슨병, 셀룰로플라스민, 완전셀룰로플라스민, 효소면역측정법, 혈액 스왓, 스크리닝 검사, 조기 진단.

【명세서】**【발명의 명칭】**

혈액 여과지에서의 효소면역측정법을 이용한 셀룰로플라스민 농도 측정 방법
및 이 방법을 이용한 윌슨병 스크리닝 검사용 키트와 진단 시약 {Method of
measurement for ceruloplasmin concentration with enzyme-linked immunosorbent
assay in filter paper, and Wilson's disease screening test kit and diagnosis
reagent using thereof}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 완전셀룰로플라스민을 포함하는 정제된 셀룰로플라스민(1)과 셀룰로
플라스민-셀룰로플라스민 특이적 항체 혼합액을 37℃에서 반응시킨 것(2)을 비
변성 전기영동하여 젤을 옥시다아제 활성 염색법으로 염색한 결과를 나타내는 도
면이다.

도 2는 여러 농도의 셀룰로플라스민을 포함하는 표준 혈액 스왑을 이용하여
본 발명에서 개발한 효소 면역 측정법을 이용하여 얻은 표준 농도 곡선이다.

도 3는 도 2의 표준 농도 곡선을 이용하여 정상인 5명과 윌슨병 환자 9명의
완전셀룰로플라스민을 측정한 결과이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<4> 본 발명은 완전셀룰로플라스민(holoceruloplasmin)의 농도를 측정하는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 완전셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체 (polyclonal antibody)와 완전셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체 (monoclonal antibody)를 사용하여 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)을 통해 얻은 흡광도 표준곡선을 이용하여 혈액 스팟에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법에 관한 것이다.

<5> 이와 같이 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법은 윌슨병 진단에 유용하게 이용될 수 있다.

<6> 윌슨병(Wilson disease)은 1912년에 처음으로 보고되었으며 전 세계적으로 2만 5천-3만 명에 1명의 빈도로 발생하는 상염색체 열성(autosomal recessive)질환으로서 보인자율이 1/90으로 비교적 흔한 유전질환의 하나이다. 구리대사과정에 장애가 있는 윌슨병에서는 담도로의 구리 배출이 감소되고 구리가 셀룰로플라스민에 흡수되는 데에 이상이 있는 등의 특징이 있다. 구리의 담도 배설 장애로 인하여 구리가 간, 뇌, 각막, 적혈구, 신장 등에 침착하게 됨으로써 간염, 간경변 등의 간 기능 장애, 구움 장애 등의 신경 장애, 용혈성 빈혈, 신세뇨관 기능 이상 등이 일어난다.

<7> 대부분의 월슨병 환자들은 이미 간경화, 신경학적 손상과 같은 질환이 진행된 후에 발견되며 간이식 등이 필요하고 치유가 불가능하며 심지어는 죽음에 이르게까지 하는 등의 치명적인 질환이지만, 조기에 발견되어 디페니실아민(D-phenicillamine), 트리에틸렌 테트라민(Triethylene tetramine)과 같은 구강용 킬레이트제를 이용하여 조기에 적절한 치료를 시작하는 경우 합병증 없이 정상적인 일상 생활을 영위할 수 있으므로 조기 진단 및 치료가 매우 중요한 병이다.

<8> 월슨병의 진단에 있어서 중요한 지표 중의 하나는 혈액내의 셀룰로플라스민의 농도이다. 셀룰로플라스민은 분자량이 132,000 dalton인 물질로서 분자당 6개의 구리 원자가 결합될 수 있는 구조를 가지고 있으며, 정상적으로는 생체 내 구리의 95% 정도를 함유하고 있는 혈장 단백질로서 조직내로의 구리 운반, 방향족 아민 옥시다아제 활성화, 항산화 작용, 자유 라디칼 및 과산화수소(H_2O_2)의 제거, 염증성 반응의 조절 등에서 다양한 역할을 하고 있다. 셀룰로플라스민은 정상인의 혈청 내에서는 20-50 mg/dl (200-500 μ g/ml) 정도로 측정되지만 월슨병 환자에서는 매우 낮게 측정되는 특징이 있다. 특히, 정상인에게 있어서 셀룰로플라스민은 옥시다아제 활성이 있고 구리가 포함된 완전셀룰로플라스민 형태로 대부분 존재하고, 구리가 제거되고 옥시다아제 활성이 없는 아포셀룰로플라스민(apoceruloplasmin) 형태가 극소수 존재한다(3.3 ± 3.1 mg/dl : 33 ± 31 μ g/ml). 그러나 월슨병 환자에게서는 아포셀룰로플라스민의 양은 정상인과 거의 비슷한 수준(2.7 ± 2.0 mg/dl : 27 ± 20 μ g/ml)으로 존재하나 완전셀룰로플라스민은 정상인에 비해 매우 낮게 존재한다.

- <9> 따라서, 혈액 내의 셀룰로플라스민, 특히 완전셀룰로플라스민을 측정하는 방법은 월슨병을 고감도로 진단하는 데 있어 매우 중요하다. 한편 신생아 시기의 경우 셀룰로플라스민의 농도가 낮게 측정되기 때문에 선별 검사의 효율이 떨어지므로, 선별 검사의 적절한 시기는 그 농도가 정상 성인의 수준에 도달하는 3-5세 정도가 적당하다고 보고되어 있다.
- <10> 종래의 셀룰로플라스민 측정 방법으로는 혈청 시료를 이용하는 것으로 셀룰로플라스민의 옥시다아제 활성(oxidase activity)을 통해 완전셀룰로플라스민을 측정하는 방법, 폴리클로날 항체를 이용한 방사상 면역확산법(radial immunodiffusion assay), 면역 비탁법(immunoturbidimetric assay) 등이 있다.
- <11> 셀룰로플라스민의 옥시다아제 활성 측정 방법은 셀룰로플라스민에 대해서만 특이적인 기질이 없기 때문에 셀룰로플라스민만을 측정하기가 힘들다. 폴리클로날 항체를 이용하는 측정방법에서는 폴리클로날 항체가 완전셀룰로플라스민 뿐만 아니라 아포셀룰로플라스민과도 결합하기 때문에 특이성이 낮은 단점이 있다.
- <12> 또한 전술한 방법들을 시행하기 위해서는 혈액에서 별도의 원심분리 과정을 거쳐 혈청을 분리해야 하는 불편함이 있으며 채취 후 혈청 내의 단백질의 안정성 문제로 인해 항상 동결된 상태로 보관되고 운반되어야 한다. 이와 같이 기존의 방법들은 시료의 채취, 운반, 보관 등이 불편하고 한번에 측정할 수 있는 시료의 수가 한정되어 있기 때문에 많은 수의 시료를 측정해야만 되는 전국적인 선별 검사방법으로는 이용될 수 없었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <13> 본 발명은 완전셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체와 완전셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체를 사용하여 효소면역측정법을 통해 얻은 흡광도 표준 곡선을 이용하여 혈액 스왓에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <14> 본 발명은 완전셀룰로플라스민 분자의 옥시다아제 활성에 중요한 에피토프(epitope)와 같은 분자의 다른 에피토프를 인지하는 두 개의 모노클로날 항체 또는 모노클로날 항체와 폴리클로날 항체 또는 두 개의 폴리클로날 항체를 이용하여 샌드위치 방법으로 혈액내 완전셀룰로플라스민을 정량분석함으로써 월슨병을 조기 진단하는 것을 다른 목적으로 한다.
- <15> 본 발명은 완전셀룰로플라스민을 포함하는 정제된 인체 셀룰로플라스민을 토끼에게 면역시켜 얻은 혈청으로부터 셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체를 제조하는 방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- <16> 본 발명은 완전셀룰로플라스민을 포함하는 정제된 셀룰로플라스민을 생쥐에게 면역시켜 항체를 생산하는 비장세포를 얻고, 상기 비장세포를 세포융합 및 배양시켜 모노클로날화된 하이브리도마 세포를 얻는 과정을 통해 셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체를 제조하는 방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- <17> 본 발명은 표준혈액스왓과 대조혈액스왓을 제조하는 방법 및 퍼옥시다아제 표지된 셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체를 이용하여

효소면역측정법을 통해 샌드위치 방법으로 흡광도 표준곡선을 작성하는 방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

<18> 본 발명은 완전셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체와 완전셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체, 표준혈액스팟 및 대조혈액스팟을 사용하여 효소면역측정법을 통해 얻은 흡광도 표준곡선으로 혈액 스팟에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정할 수 있도록 하는 것을 특징으로 하는 월슨병 진단 시약 및 월슨병 스크리닝 검사용 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

<19> 본 발명은 월슨병을 조기 진단하는 스크리닝 검사 키트를 제공함으로써, 현재 사용되고 있는 검사법들과는 차별화하여 혈액 여과지(filter paper)로 수집한 3-5세 유아의 혈액 스팟으로부터 구리가 포함된 완전셀룰로플라스민을 효소면역측정법으로 정량분석하는 방법을 제공하며, 따라서 셀룰로플라스민 측정시 다량의 혈액을 채취하지 않고 한 두 방울의 혈액만으로 선별검사를 가능하게 하는 것을 목적으로 한다.

<20> 궁극적으로 본 발명은 한 번에 많은 수의 시료를 측정할 수 있도록 시료의 채취, 운반, 보관 등이 간편한 혈액 스팟을 이용하여 추출되는 구리를 포함하는 완전셀룰로플라스민을 효소면역측정법을 통해 정량 분석하는 방법을 제공함으로써 월슨병을 조기 진단하는 것을 목적으로 한다.

【발명의 구성 및 작용】

- <21> 이러한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 완전셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체와 완전셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체를 사용하여 효소면역측정법을 통해 얻은 흡광도 표준곡선을 이용하여 혈액 스팟에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법을 제공한다.
- <22> 보다 구체적으로 본 발명은
- <23> 셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체를 제조하는 단계;
- <24> 셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체를 제조하는 단계;
- <25> 상기 셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체와 상기 셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체에 퍼옥시다아제를 표지하는 단계;
- <26> 셀룰로플라스민이 제거된 혈액을 제조하고, 이 혈액에 완전셀룰로플라스민을 포함하는 정제된 셀룰로플라스민 용액을 일정 농도로 첨가하여 표준혈액스팟과 대조혈액스팟을 제조하는 단계; 및
- <27> 상기 셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체와 셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체들을 이용하여 표준혈액스팟과 대조혈액스팟으로부터 흡광도 표준곡선을 작성하는 단계;
- <28> 상기 표준곡선을 이용하여 환자의 혈액스팟으로부터 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 효소면역측정법을 이용하여 혈액 스팟에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법을 제공한다.

<29> 상기 셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체는 면역원으로서 완전셀룰로플라스민을 포함하는 정제된 셀룰로플라스민을 토끼에게 면역시켜 제조하며, 상기 셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체는 면역원으로서 완전셀룰로플라스민을 포함하는 정제된 셀룰로플라스민을 생쥐에게 면역시켜 항체를 생산하는 비장세포를 얻고, 이를 마이엘로마 세포 Sp2/0-Ag14와 기존의 잘 알려진 융합 방법으로 융합시키고 햇(HAT) 선택 배지에서 배양하고 효소 면역 측정법으로 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma) 세포들을 선택하여 제한 희석(limiting dilution) 방법으로 모노클로날화된 하이브리도마 세포들을 얻는 방법으로 제조한다.

<30> 상기 하이브리도마로부터 분리된 모노클로날 항체가 포함된 배양 상등액을 셀룰로플라스민과 반응시켜 완전셀룰로플라스민의 옥시다아제 활성을 중화시키는 능력을 확인함으로써 완전셀룰로플라스민 특이적 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 선별한다.

<31> 또한 상기 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체에 퍼옥시다아제 (Horseradish peroxidase)를 표지하여 효소면역측정법에 필요한 항체들을 준비한다.

<32> 효소면역측정법으로 완전셀룰로플라스민을 측정하여 월슨병환자와 정상인 사이의 차이점을 확인하는 방법은 셀룰로플라스민이 제거된 혈액을 제조하고, 상기 상기 혈액에 완전셀룰로플라스민을 포함하는 정제된 셀룰로플라스민 용액을 일정한 농도로 첨가하여 표준 혈액 스팟과 대조 혈액 스팟을 제조한 다음 상기의 표준 혈액 스팟과 항체들을 이용하여 샌드위치 방법으로 표준곡선을

만들고, 상기 표준곡선을 이용하여 같은 방법으로 월슨병 환자와 정상인의 시료로부터의 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 단계로 이루어진다.

<33> 이하 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 단, 하기 실시예들은 단지 예시적인 목적으로 기술된 것으로서 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

<34> 실시예 1 : 셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체의 제조

<35> 본 실시예에서는 미국의 시그마(Sigma)사에서 구입한 완전셀룰로플라스민을 포함한 정제된 인체 셀룰로플라스민을 사용하였다. 항원 특이적 폴리클로날 항체를 생성하기 위하여 1 mg/ml 농도로 인산완충용액 중에 용해된 정제된 셀룰로플라스민 용액 400 μ l를 동량의 프로인트 면역 보강제(Freund's adjuvant; BRL사에서 시판)로 유화시킨 후 10주된 토끼에게 11일 간격으로 4회 근육주사하였다. 4번째 근육주사한 10일 후 심장천공법으로 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액을 상온에서 30분 그리고 4℃에서 하룻밤동안 방치하여 완전 응고시킨 후 2,500rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취함으로써 혈청을 얻었다. 이것에 최종 농도가 40% 되도록 황산암모늄(ammonium sulfate)을 첨가하여 침전시키고 10 mM 인산완충용액(pH 7.0)에 하룻밤동안 투석시킨 후 DEAE Affi-Gel Blue gel(Bio-Rad사에서 시판)로 항체를 정제하였다.

<36> 실시예 2 : 셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체의 제조

<37> 본 발명에서 사용된 모노클로날 항체는 1 mg/ml 농도의 정제된 셀룰로플라스민 100 μ l을 동일한 양의 프로인트 면역 보강제로 유화시킨 후 생후 6-8주된

발브씨(BALB/c) 생쥐에게 2주 간격으로 3회 복강내에 주입하였다. 마지막 주입 후 항 셀룰로플라스민 항체의 생성을 확인하고 2주 후에 100 μ g의 셀룰로플로스민을 마지막으로 면역시킨 다음 3일 후 생쥐로부터 비장세포를 추출하고 Sp2/0-Ag14 마이엘로마(myeloma) 세포와 10:1 비율로 혼합하여 이 혼합액을 50% 폴리에틸렌글라이콜 1500(polyethyleneglicol 1500)용액에 3분동안 방치시켜 세포 융합을 실시하였다. 이것을 1,200rpm에서 8분동안 원심분리하여 세포 침전물을 얻은 후 10% 우태아 혈청 (fetal calf serum)을 함유한 HAT RPMI-1640 배지에 ml 당 3.5×10^6 세포가 되도록 부유시켜 96-웰 플레이트(96-well plate)에 웰당 0.1 ml씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 3일 후 10% 우태아 혈청 함유 HAT RPMI-1640 배지를 웰당 0.1 ml씩 첨가하고 4일 마다 배지의 반 정도를 신선한 배지로 갈아주었다.

<38> HAT 선택 배양 후 하이브리도마 세포의 항체 생산 여부를 효소면역측정법으로 확인하였다. 즉, 상기에서 면역에 사용했던 셀룰로플라스민을 0.01 M 카보네이트 바이카보네이트 완충액(carbonate-bicarbonate pH9.6)에 0.1 μ g/ml로 희석하여 웰마다 50 μ l씩 넣고 4°C에서 하룻밤동안 코팅(coating)하였다. 그 다음에 PBST(phosphate buffer saline, 0.15 % Tween 20)로 3회 세척하고, 1 % 알부민으로 실온에서 2시간동안 반응(blocking)시켰다. 세포의 배양상등액은 웰마다 50 μ l씩 넣고 실온에서 2시간동안 반응시킨 후에 PBST로 3회 세척하였다. 바이오틴이 붙어있는 2차 항체인 항 생쥐 면역글로불린 항체(Biotin conjugated anti-mouse immunoglobulin antibody)를 1 μ g/ml이 되도록 1 % BSA-PBST로 희석한 후에 웰마다 50 μ l씩 넣고 1시간동안 37°C에서 반응시켰다. 다시 PBST로 3회 세척한 후에

스트렙타비딘-퍼옥시다아제(Streptavidin-Horseradish Peroxidase)를 1 % BSA-PBST로 1000배 희석하여 웰마다 50 μ l씩 넣고 30분동안 37℃에서 반응시킨 후에 다시 PBST로 4회 세척하였다. 효소반응을 위한 기질로는 티엠비(Tetra-Methylbenzidine : TMB)용액을 웰마다 50 μ l씩 넣고 실온에서 반응시킨 후에 2 N-황산으로 반응을 정지시키고 450 nm 파장에서 ELISA 판독기로 흡광도를 측정하였다. 항 셀룰로플라스민 항체의 생성여부를 확인하여 양성을 보이는 웰에서 얻은 세포들은 제한희석법 (limiting dilution)으로 웰당 0.3 세포가 되도록 3회 전클로닝(subcloning)하여 배양함으로써 모노클로날화하여 항 셀룰로플라스민 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 얻었다.

- <39> 실시예 3 : 항체의 셀룰로플라스민 옥시다아제 활성의 중화 확인
- <40> 10 μ g의 정제된 셀룰로플라스민과 실시예 2에서 얻은 동일한 부피의 하이브리도마의 배양상등액을 섞어 37℃에서 30분동안 반응시켜 4℃에서 비변성 폴리아크릴아마이드젤 (7.5%)로 전기영동하였다. 전기영동 후 셀룰로플라스민의 옥시다아제 활성을 확인하기 위해서 염색용액으로는 페라-페닐렌다이아민(*p*-phenylenediamine)이 1 mg/ml 농도로 들어있는 아세트산 나트륨 완충용액 (0.1 M sodium acetate, pH 5.7)을 사용하여 37℃에서 2시간 동안 젤을 염색시키고 50% 에탄올 용액에서 탈색시켰다 (도 1).
- <41> 도 1의 결과로부터 알 수 있듯이 정제된 셀룰로플라스민은 자체적인 옥시다아제 활성에 의하여 무색의 페라-페닐렌다이아민을 산화시켜 자주색의 밴드를 형성하였다. 반면에 셀룰로플라스민과 셀룰로플라스민 특이적 항체 혼합액에서는

항체가 셀룰로플라스민의 옥시다아제 활성을 중화시켰기 때문에 자주색의 밴드가 형성되지 않았다. 이로써 실시예 2에서 제작한 모노클로날 항체는 옥시다아제 활성이 있는 완전셀룰로플라스민에 특이적인 특징을 가지고 있음을 알 수 있다.

<42> 실시예 4 : 완전셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체 정제

<43> 실시예 3에서 선별된 완전셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 RPMI 배지가 들어있는 T75 플라스크에 접종하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 7일간 배양한 후 원심분리하여 배양 상등액을 얻고 황산암모늄을 최종 농도가 50%가 되도록 첨가하여 침전시키고 10 mM 인산완충용액(pH7.0)에 하룻밤동안 투석시킨 후 DEAE Affi-Gel Blue gel로 항체를 정제하였다.

<44> 실시예 5 : 퍼옥시다아제 결합 항 셀룰로플라스민 항체의 제조

<45> 실시예 1과 4에서 정제된 항체 5 mg과 동일량의 퍼옥시다아제를 0.1 M 인산완충액 (pH 6.8)에 섞어 하룻밤동안 투석시키고 0.1M 인산완충액으로 최종농도 1%로 희석된 글루타알데하이드(glutaraldehyde)용액을 첨가하여 상온에서 3시간 동안 천천히 교반시키면서 2 M 글리신을 최종농도 0.1 M이 되도록 첨가하여 상온에서 2시간동안 방치하였고 다시 인산완충액에서 하룻밤동안 투석시키고 10,000 g에서 30분동안 원심분리하여 얻은 상등액에 동일한 부피의 글리세롤 (glycerol)을 첨가하여 -20 °C에 저장하였다.

<46> 실시예 6 : 셀룰로플라스민이 없는 혈액의 제조

<47> 혈액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 윗 층에 있는 혈장 부분은 버리고 3% 알부민이 첨가된 인산 완충액을 첨가하여 섞은후 동일한 방법으로 원심

분리한다. 3% 알부민 용액으로 세척을 5회 반복 후에는 1,500 rpm에서 10분 원심 분리하여 혈장 부분은 버리고 3% 알부민이 첨가된 인산 완충액을 첨가한 뒤 동일한 조건에서 4회 반복 세척 후 혈장이 제거된 적혈구(RBC : Red Blood Cell) 층만을 얻는다.

<48> 실시예 7 : 표준 혈액 스팟 제조

<49> 실시예 6번에서 만들어진 셀룰로플라스민이 없는 혈액에 알고 있는 농도의 셀룰로플라스민을 첨가하여 표준농도의 범위를 결정한다. 표준 셀룰로플라스민 농도는 0 mg/dl, 0.5 mg/dl, 1 mg/dl, 2 mg/dl, 5 mg/dl, 10 mg/dl, 20 mg/dl, 50 mg/dl 로 8개의 범위로 한다. 표준 혈액 스팟을 만들 때 실시예 6번에서 만든 혈액에 알고 있는 셀룰로플라스민 용액을 1:1로 섞은 다음 마지막으로 본래의 헤마토크리트를 맞춘다. 따라서 각각의 표준 농도 용액을 만들때는 2배 농축하여 실시예 6에서 만든 혈액과 섞어 혈액 여과지에 떨어뜨려 상온에서 하룻밤동안 말린다.

<50> 실시예 8 : 대조 혈액 스팟 제조

<51> 대조 혈액 스팟(control blood spot)의 제조는 실시예 7과 동일한 방법으로 시행하며, 대조군의 셀룰로플라스민 범위는 0.7 mg/dl(0.41~0.99), 3 mg/dl(1.40~4.80), 10 mg/dl(6.10~14.0)로 3가지 범주로 한다. 표준 혈액 스팟 제조방법과 같이 혈액과 1:1의 비율로 섞어 필터 페이지에 떨어뜨려 상온에서 하룻밤동안 말린다.

<52> 실시예 9 : 효소면역 측정법을 이용한 혈액 스팟으로부터 셀룰로플라스민 측정 (모노클로날 항체-모노클로날 항체 샌드위치 방법)

<53> 혈액 스팟에 있는 셀룰로플라스민 양을 측정하기 위해 먼저 실시예 2와 4에서 제작한 항 완전셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체를 0.05 M 카보네이트 바이카보네이트 완충액에 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하여 웰 마다 100 μl 씩 넣고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤동안 코팅한다. 그 다음에 0.1% 트윈 20을 첨가한 인산 완충액(Phosphate Buffer Salin, 0.1% Tween 20)으로 4회 세척하고 3% 알부민이 든 인산 완충액으로 실온에서 5-8시간 동안 반응시킨다. 동일한 방법으로 세척한 후 펀치(punch)를 사용하여 3mm 정도의 혈액 스팟을 뚫어서 각각의 웰에 넣는다. 여기에 용출을 위한 용액을 혈액 스팟이 잠기도록 웰마다 100 μl 씩 넣어주고 이것을 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 반응시킨다. 그 다음에 혈액 스팟을 제거하고 0.1% 트윈 20이 들어간 인산 완충액으로 4회 세척한 다음, 실시예 5에서 제작한 퍼옥시다아제가 붙어있는 2차 모노클로날 항체를 1% 알부민을 0.1% 트윈 20을 첨가한 인산 완충액으로 500:1로 희석한 후에 웰마다 100 μl 씩 넣고 실온에서 90분 동안 반응시킨다. 다시 0.1% 트윈 20을 첨가한 인산 완충액으로 4회 세척한다. 효소반응을 위한 기질로는 티엠비 용액을 웰마다 100 μl 씩 넣고 실온에서 반응시킨 후 2N-황산으로 반응을 정지시키고 450nm 파장에서 ELISA 판독기로 흡광도를 측정한다.

<54> 실시예 10 : 효소면역 측정법을 이용한 혈액 스팟으로부터 셀룰로플라스민 측정 (모노클로날 항체-폴리클로날 항체 샌드위치 방법)

- <55> 혈액 스왑에 있는 셀룰로플라스민 양을 측정하기 위해 실시예 9와 동일한 방법으로 측정하되 2차 항체로는 실시예 1과 5에서 제작한 퍼옥시다아제가 붙어 있는 폴리클로날 항체를 하였다.
- <56> 실시예 11 : 효소면역 측정법을 이용한 혈액 스왑으로부터 셀룰로플라스민 측정 (폴리클로날 항체-폴리클로날 항체 샌드위치 방법)
- <57> 혈액 스왑에 있는 셀룰로플라스민 양을 측정하기 위해 실시예 9와 동일한 방법으로 측정하되 코팅항체로는 실시예 1번에서 제작한 다클론항체를, 2차 항체로는 실시예 1번과 5번에서 제작한 퍼옥시다아제가 붙어있는 폴리클로날 항체를 하였다.
- <58> 실시예 12 : 정상인과 월슨병 환자에서의 셀룰로플라스민 정량 분석
- <59> 정상인 5명과 월슨병 환자 9명의 혈액을 채혈하여 혈액 스왑을 만들어서 하룻밤동안 말린 다음 실시예 9의 방법으로 도 2의 표준농도곡선을 이용하여 셀룰로플라스민의 농도를 측정하였다 (도 3).
- <60> 도 3의 결과로 알 수 있듯이 월슨병 환자의 셀룰로플라스민의 농도는 정상인과 비교했을 때 현저히 낮게 측정됨을 볼 수 있다. 이러한 결과는 본 발명의 진단시약이 월슨병을 진단하는데 있어서 높은 선별력을 가지고 있음을 보여준다.

【발명의 효과】

- <61> 본 발명은 월슨병을 조기 진단하는 스크리닝 검사 키트를 제공함으로써, 현재 사용되고 있는 검사법들과는 차별화하여 혈액 여과지로 수집한 3-5세 유아의

혈액 스왓으로부터 구리가 포함된 완전셀룰로플라스민을 효소면역측정법으로 정량분석하는 방법을 제공하며, 따라서 셀룰로플라스민 측정시 다량의 혈액을 채취하지 않고 한 두 방울의 혈액만으로 월슨병을 조기에 진단할 수 있게 한다.

<62> 본 발명은 완전셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체와 완전셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체, 표준혈액스왓 및 대조혈액스왓을 사용하여 효소면역측정법을 통해 얻은 흡광도 표준곡선으로 혈액 스왓에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정할 수 있도록 하는 것을 특징으로 하는 월슨병 진단 시약 및 월슨병 진단용 키트를 제공함으로써, 시료의 채취, 운반, 보관 등이 간편할 뿐만 아니라 한꺼번에 많은 시료를 측정할 수 있어 보다 많은 사람을 대상으로 월슨병을 선별 검사 하는 데에 특히 유용하다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

완전셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체와 완전셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체를 사용하여 효소면역측정법을 통해 얻은 흡광도 표준곡선을 이용하여으로써 혈액 스왓에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 혈액 스왓이 혈액 여과지로 수집된 것을 특징으로 하는 혈액 스왓에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법.

【청구항 3】

제1항에 있어서,

상기 셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체가 완전셀룰로플라스민을 포함하는 정제된 인체 셀룰로플라스민을 토끼에게 면역시켜 얻은 혈청으로부터 제조되는 것을 특징으로 하는 혈액 스왓에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서,

상기 셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체가 완전셀룰로플라스민을 포함하는 정제된 셀룰로플라스민을 생쥐에게 면역시켜 항체를 생산하는 비장세포를 얻고, 상기 비장세포를 세포융합 및 배양시켜 모노클로날화된 하이브리도마 세포를 얻음으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 혈액 스팟에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법.

【청구항 5】

제1항에 있어서,

상기 효소면역측정법을 통해 얻은 흡광도 표준곡선이 상기 셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체와 셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체에 퍼옥시다아제를 표지하고, 표준혈액스팟과 대조혈액스팟을 제조하여 상기 퍼옥시다아제 표지된 항체들을 이용하여 작성되는 것을 특징으로 하는 혈액 스팟에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법.

【청구항 6】

제5항에 있어서,

상기 흡광도 표준곡선이 표준혈액스팟과 대조혈액스팟을 제조하여 상기 퍼옥시다아제 표지된 셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체를 이용하여 샌드위치 방법으로 작성되는 것을 특징으로 하는 효소면역측정법을 이용하여 혈액 스팟에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법.

【청구항 7】

셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체를 제조하는 단계;

셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체를 제조하는 단계;

상기 셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체와 상기 셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체에 퍼옥시다아제를 표지하는 단계;

셀룰로플라스민이 제거된 혈액을 제조하고, 이 혈액에 완전셀룰로플라스민을 포함하는 정제된 셀룰로플라스민 용액을 일정 농도로 첨가하여 표준혈액스팟과 대조혈액스팟을 제조하는 단계; 및

상기 셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체와 셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체들을 이용하여 표준혈액스팟과 대조혈액스팟으로부터 흡광도 표준곡선을 작성하는 단계;

상기 표준곡선을 이용하여 환자의 혈액스팟으로부터 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 효소면역측정법을 이용하여 혈액 스팟에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법.

【청구항 8】

제7항에 있어서,

상기 환자가 윌슨병 환자인 것을 특징으로 하는 효소면역측정법을 이용하여 혈액 스팟에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법.

【청구항 9】

제7항에 있어서,

상기 셀룰로플라스민이 제거된 혈액을 제조하는 단계가 알부민을 포함하는 인산완충액을 사용하는 것을 특징으로 하는 효소면역측정법을 이용하여 혈액 스팟에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법.

【청구항 10】

제7항에 있어서,

상기 알부민이 3%인 것을 특징으로 하는 효소면역측정법을 이용하여 혈액 스팟에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법.

【청구항 11】

제7항에 있어서,

상기 표준혈액스팟과 대조혈액스팟을 제조하는 단계가 셀룰로플라스민이 제거된 혈액에 이미 알고 있는 농도의 셀룰로플라스민을 첨가함으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 효소면역측정법을 이용하여 혈액 스팟에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법.

【청구항 12】

제11항에 있어서,

상기 혈액에 첨가되는 이미 알고 있는 셀룰로플라스민의 농도가 3가지 이상인 것을 특징으로 하는 효소면역측정법을 이용하여 혈액 스왓에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법.

【청구항 13】

제7항에 있어서,

상기 셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체를 제조하는 단계에 완전셀룰로플라스민의 옥시다아제 활성을 중화시키는 항체를 식별하는 단계가 추가로 포함되는 것을 특징으로 하는 효소면역측정법을 이용하여 혈액 스왓에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법.

【청구항 14】

제7항에 있어서,

상기 셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체를 제조하는 단계 다음에 이 항체를 정제하는 단계가 추가로 포함되는 것을 특징으로 하는 효소면역측정법을 이용하여 혈액 스왓에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정하는 방법.

【청구항 15】

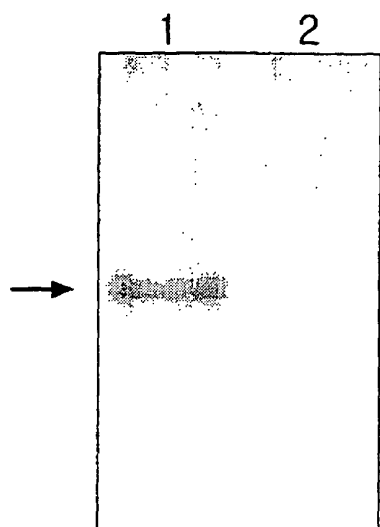
완전셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체와 완전셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체, 표준혈액스팟 및 대조혈액스팟을 포함하는 것을 특징으로 하는 월슨병 진단 시약.

【청구항 16】

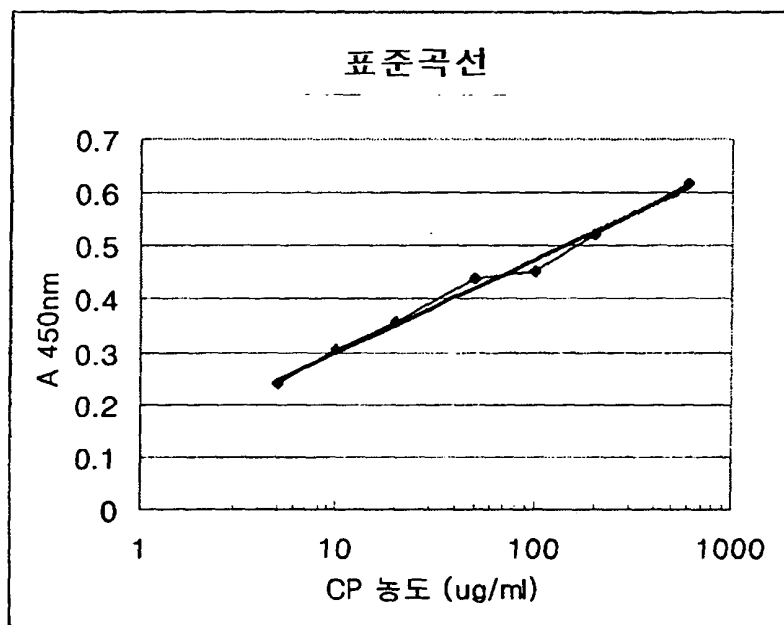
완전셀룰로플라스민 특이적 폴리클로날 항체와 완전셀룰로플라스민 특이적 모노클로날 항체, 표준혈액스팟 및 대조혈액스팟을 사용하여 효소면역측정법을 통해 얻은 흡광도 표준곡선으로 혈액 스팟에서 완전셀룰로플라스민의 농도를 측정할 수 있도록 하는 것을 특징으로 하는 월슨병 스크리닝 검사용 키트.

【도면】

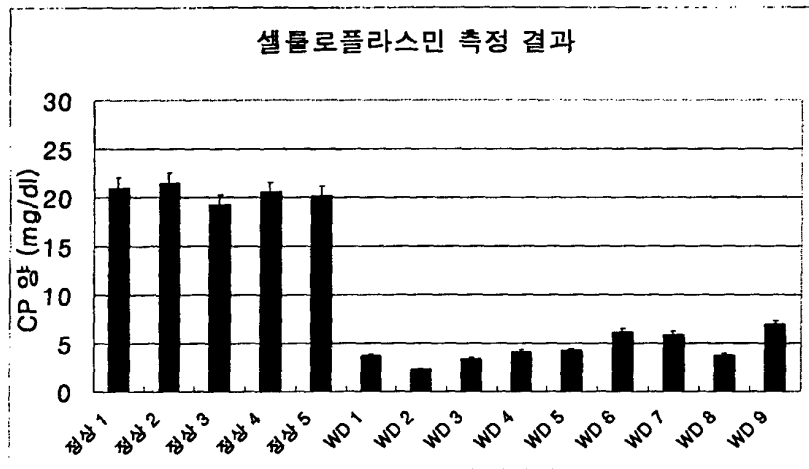
【도 1】



【도 2】



【도 3】



	【서지사항】
【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.04.06
【출원인】	
【명칭】	제노백 (주)
【출원인코드】	1-2000-048470-2
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	고 승 호
【대리인코드】	9-1998-000118-1
【포괄위임등록번호】	2000-059758-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2001-0017100
【출원일자】	2001.03.31
【심사청구일자】	2001.03.31
【발명의 명칭】	혈액 여과지에서의 효소면역측정법을 이용한 셀룰로플라스민 농도 측정 방법 및 이 방법을 이용한 월슨병 스크리닝 검사용 키트와 진단 시약
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-01-0073378-58
【접수일자】	2001.03.31
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상 항목】	발명자
【보정방법】	정정
【보정내용】	
【발명자】	
【성명의 국문표기】	한 시 훈
【성명의 영문표기】	HAN,SI HOON
【주민등록번호】	580308-1023118
【우편번호】	463-060

【주소】	경기도 성남시 분당구 이매동 삼환아파트 1104-2001
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이 수 영
【성명의 영문표기】	LEE,SU YOUNG
【주민등록번호】	620318-2023110
【우편번호】	440-814
【주소】	경기도 수원시 장안구 연무동 251 광교프라자 1101호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	장 영 주
【성명의 영문표기】	JANG,YOUNG JU
【주민등록번호】	561120-2029318
【우편번호】	463-825
【주소】	경기도 성남시 분당구 수내동 76번지 푸른마 을 507동 202호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	신 하 철
【성명의 영문표기】	SHIN,HA CHOL
【주민등록번호】	721127-1260811
【우편번호】	442-380
【주소】	경기도 수원시 팔달구 원천동 77-35
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박 선 영
【성명의 영문표기】	PARK,SUN YOUNG
【주민등록번호】	760211-2386315
【우편번호】	442-192
【주소】	경기도 수원시 팔달구 우만 2동 51-2번지 101 호
【국적】	KR

【발명자】**【성명의 국문표기】**

유 은 선

【성명의 영문표기】

YU, EUN SUN

【주민등록번호】

770813-2231313

【우편번호】

431-051

【주소】

경기도 안양시 동안구 비산 1동 534-15호

【국적】

KR

【취지】

특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이
제출합니다. 대리인
고 승 호 (인)

【수수료】**【보정료】**

0 원

【기타 수수료】

원

【합계】

0 원

【서지사항】

【서류명】 서지사항 보정서

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2001.05.14

【출원인】

【명칭】 제노백 (주)

【출원인코드】 1-2000-048470-2

【사건과의 관계】 출원인

【대리인】

【성명】 고승호

【대리인코드】 9-1998-000118-1

【포괄위임등록번호】 2000-059758-1

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2001-0017100

【출원일자】 2001.03.31

【심사청구일자】 2001.03.31

【발명의 명칭】 혈액 여과지에서 효소면역측정법을 이용한 셀룰로플라스민 농도 측정 방법 및 이 방법을 이용한 월슨병 스크리닝 검사용 키트와 진단 시약

【제출원인】

【발송번호】 1-5-2001-0019610-95

【발송일자】 2001.04.21

【보정할 서류】 특허출원서

【보정할 사항】

【보정대상 항목】 첨부서류

【보정방법】 제출

【보정내용】

【첨부서류】 1. 소기업임을 증명하는 서류_1통[사업장면적
확인서류(등기 부등본)]

【취지】 특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이
제출합니다. 대리인
고승호 (인)

【수수료】**【보정료】** 0 원**【기타 수수료】** 0 원**【합계】** 0 원**【첨부서류】** 1. 기타첨부서류_1통[등기부 등본]